

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 5 6 6 号	学位授与年月日	平成 22 年 3 月 15 日
氏 名	小 林 祥		
論文題目	<p>Temporal-spatial expression of presenilin 1 and the production of amyloid-β after acute spinal cord injury in adult rat (成熟ラット急性脊髄損傷におけるプレセニリン 1 とその生成物アミロイドβの経時的部位的発現)</p>		

博士(医学) 小林 祥

論文題目

Temporal-spatial expression of presenilin 1 and the production of amyloid- β after acute spinal cord injury in adult rat

(成熟ラット急性脊髄損傷におけるプレセニリン 1 とその生成物アミロイド β の経時的部位的発現)

論文の内容の要旨

[はじめに]

細胞外から細胞内への情報伝達経路として、regulated intramembrane proteolysis (RIP) によるシグナル伝達が近年注目されている。RIP では γ セクレターゼという複合体酵素により膜蛋白質が切断され、その細胞内断片が膜より核内に移行し遺伝子発現を制御する。 γ セクレターゼは様々な膜蛋白質を基質とし、発生や分化・細胞接着などに重要な機能を持ち、RIP の制御による悪性腫瘍や関節リウマチ、アルツハイマー病の治療が試みられている。またラット脳損傷においてもこの γ セクレターゼを制御することにより 2 次障害を抑制できたとの報告もある。プレセニリン 1 (PS1) はこの γ セクレターゼ複合体の活性中心を担い、PS1 の変異により脳や脊髄に易凝集性 Amyloid β (A β) が蓄積し、神経細胞の脱落壊死と脳や脊髄の萎縮をきたし、家族性アルツハイマー病の発症や痙性対麻痺を呈することが分かっている。しかし PS1 の脊髄における生理的意義は十分に研究されてなく、脊髄損傷との関与も明らかではない。そこで本研究では、脊髄損傷における RIP の関与を明らかにし、また脊髄損傷に対する治療法の開発に必須である基礎的知見を集積するため、ウェスタンブロット法 (WB) と免疫組織化学染色法 (IHC) を用いてラット脊髄損傷における PS1 の発現変化について検討した。

[材料ならびに方法]

雄性 Wistar 系ラット(7 週齢、n=48)の第 8 胸椎の椎弓切除を行い、脊髄の右側をメスにて半切し脊髄部分損傷モデルを作製した。切断後 1、3、7、14 日に切断部を回収し左右に分割し WB を行い、内部標準である β -actin とそれぞれの信号強度の比を解析ソフト Image J を用いて測定した。また各脊髄の切断部の冠状断面標本を作製し、抗 PS1 抗体を用いて IHC を行い切断後 1、3、7、14 日の PS1 の発現を比較した。さらに切断部より頭尾側 1 mm 毎に分け切片を作製し、PS1 陽性シグナルを Image J を用いて定量することにより部位的発現について検討した。次に抗 Amyloid precursor protein (APP) 抗体(γ セクレターゼの基質となる APP を認識)、抗 A β 抗体、抗 Notch1 抗体(APP と別の γ セクレターゼの基質となる Notch1 を認識) と抗 PS1 抗体との二重染色を行った。また axon、astrocyte、oligodendrocyte のマーカーである抗 neurofilament (NF) 抗体、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体、抗 myelin basic protein (MBP) 抗体と抗 PS1 抗体との二重染色を行った。コントロールは正常ラット胸髄を用いて、統計解析は ANOVA を使用した。

[結果]

WB において、PS1 は損傷後 1 日に切断側でコントロールと比し有意に増加した。また APP は損傷後 1、3、7、14 日に、A β は損傷後 1、3 日に損傷側で有意に増加した。つまり PS1、APP、A β は少なくとも損傷後 1 日に発現の増加が重なった。IHC では損傷側白質の軸索腫大部に PS1 が存在し、損傷後 1、3 日に増加し、損傷後 7、14 日には減少した。また損傷後 1 日目では切断側の頭

尾側 1 mm の部位で有意に PS1 の発現が増加し、損傷部から離れるにしたがい発現は減少した。上行性、下行性経路の違いや損傷の頭尾側の違いによる PS1 の発現の差はなかった。二重染色では PS1 と APP、A β 、Notch1 は損傷側白質で共局在を示した。さらに PS1 は NF と共局在したが、GFAP や MBP との局在は一致しなかった。

[考察]

脊髄損傷において PS1 と A β が損傷軸索において発現することを、今回我々は初めて示した。PS1 が APP、A β 、Notch1 と損傷軸索部に共局在し、同様の発現上昇傾向が見られたことは、RIP によるシグナル伝達が脊髄損傷で行われている可能性を示唆する。また A β が損傷後急性期に増加していたことは、脊髄損傷部において炎症反応を引き起こし、2 次障害に関連する可能性がある。将来の脊髄再生治療を模索する上で RIP の制御は新たな可能性を与える。

[結論]

ラット脊髄損傷において、PS1 は APP、A β 、Notch1 と共に損傷軸索に集積しており、RIP によるシグナル伝達が行われている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

γ セクレターゼは様々な膜蛋白質を基質とし、発生や分化、細胞接着などに重要な機能をもち、プレセニリン 1(PS1)はこの γ セクレターゼ複合体の活性中心を担う。PS1 の変異により脳や脊髄に易凝集性 Amyloid β (A β)が蓄積し、神経細胞の脱落と脳や脊髄の萎縮をきたし、家族性アルツハイマー病や痙性対麻痺の発症にかかわる。しかし PS1 の脊髄における生理的意義は十分に研究されておらず、脊髄損傷との関与も明らかではない。

申請者はラット脊髄損傷モデルにおける PS1 とその関連分子の発現変化について検討した。雄性 Wistar 系ラット(7 週齢)の第 8 胸椎の椎弓切除を行い、脊髄の右側をメスにて半切し脊髄部分損傷モデルを作製した。切断後 1、3、7、14 日に切断部を回収し左右に分割しウエスタンブロット法を行い、また各脊髄の切断部の冠状断面標本作製し、免疫組織化学染色法を行い、PS1 と関連蛋白質の発現を比較した。さらに、細胞特異的マーカーを用い発現変化が誘導された細胞種を同定した。

ウエスタンブロットにて PS1 は損傷後 1 日に切断側で有意に増加し、Amyloid precursor protein (APP)は損傷後 1、3、7、14 日に、A β は損傷後 1、3 日に有意に増加した。免疫組織化学染色法では損傷後 1、3 日に損傷側白質の軸索腫大部に PS1 が増加し、頭尾側の違いはなかった。二重染色では PS1 は APP、A β 、Notch1、neurofilament と共局在を示し、損傷側白質の軸索に発現していることが明らかになった。

審査委員会では、申請者がこれまで脊髄損傷モデルで PS1 についての検討がなされていない点に着目し、これを明らかにしたうえで、APP、A β 、Notch1 との共存から regulated intramembrane proteolysis の関与まで示唆し、将来の脊髄再生治療への展望を示した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 福田 敦夫

副査 中原 大一郎 副査 宮嶋 裕明